



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS

NATALY SIMÕES BANDIERA

**DESENVOLVIMENTO DE UM PÓ SIMBIÓTICO PARA  
ADIÇÃO EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS**

---

Londrina  
2014

# **DESENVOLVIMENTO DE UM PÓ SIMBIÓTICO PARA ADIÇÃO EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lina Casale Aragon Alegro

Co-orientador: Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez

Londrina  
2014

NATALY SIMÕES BANDIERA

**DESENVOLVIMENTO DE UM PÓ SIMBIÓTICO PARA ADIÇÃO EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Casale Aragon Alegro  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elsa Helena Walter de Santana  
Universidade Norte do Paraná

---

Prof. Dr. Leandro Freire

Londrina, 11 de abril de 2014.

Dedico este trabalho ao meus pais que sempre me ensinaram que o melhor caminho é o conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me trazido a esse caminho e que Ele me dê cada vez mais sabedoria para exercer a profissão escolhida.

Agradeço a minha orientadora, amiga, irmã e mãe Lina, por todo ensinamento compartilhado, pelos momentos de incentivo, dedicação e principalmente pela amizade construída durante esses 7 anos de orientação, faltam palavras para expressar sua importância.

Ao professor Raúl, por suas idéias, seu conhecimento e sua boa vontade, pois sempre esteve disposto a ajudar.

Aos colegas de laboratório, a técnica Flávia e as professoras Cíntia e Elsa, que sempre me socorreram quando preciso.

As minhas amigas de mestrado Ana Beatriz e Giovanna, por todo companheirismo e amizade construída durante esses 2 anos.

Aos meus pais, por todo amor exercido e por sempre me orientar o melhor caminho a escolher.

As minhas irmãs, as quais sempre estiveram ao meu lado apoiando ou ensinando conforme necessário, e continuaram comigo por toda vida.

Ao meu esposo, por sempre me apoiar e entender meus momentos de ausência quando necessário.

"Deus não chama os qualificados, Ele qualifica os chamados."

BANDIERA, N. S. **Desenvolvimento de um pó simbiótico para adição em produtos alimentícios**. 2014. 51. Trabalho de Conclusão do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

## RESUMO

Neste trabalho, desenvolveu-se um pó simbiótico para adição em diferentes produtos alimentícios, com a utilização de microrganismo probiótico e xilo-oligossacarídeo. Para isto, foram realizadas as seguintes etapas: 1) definição das fontes de carbono e de nitrogênio a serem utilizadas, que resultaram em maior população das espécies probióticas (*Lactobacillus casei* e *L. acidophilus*) avaliadas, utilizando-se delineamento experimental fatorial fracionado padrão de  $2^{6-4}$ ; 2) otimização da concentração de cada componente selecionado na etapa anterior, dos parâmetros e da temperatura para a multiplicação dos probióticos, através de matriz experimental Box-Behnken ( $3^3$ ) além do tempo de incubação; 3) definição do método de secagem do meio formulado contendo probiótico; 4) formulação do pó simbiótico. As populações microbianas foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, e todas as análises dos dados foram realizadas utilizando-se o programa Statistica. As fontes de carbono e de nitrogênio que, juntas, promoveram maior multiplicação de *L. casei* e de *L. acidophilus* foram, respectivamente, 16% de soro de queijo (m/v) e 2,5% de sulfato de amônio (m/v) e 12% de soro de queijo (m/v) e 7% de extrato de levedura (m/v). As melhores temperaturas para a multiplicação nos meios definidos foram 35°C para *L. casei* e 39°C, para *L. acidophilus*. Não houve diferença nas populações dos dois microrganismos quando enumerados nos meios definidos, após 24h e 48h, indicando que o tempo de incubação dos probióticos nos meios, antes da secagem, pode ser de 24h. O meio definido e inoculado com *L. casei* e incubado a 35°C foi o que obteve maior população do microrganismo probiótico após secagem, acima de 9 ciclos logarítmicos. O pó desenvolvido foi formulado adicionando-se 3,5 g de xilotriose em 10g do pó probiótico contendo *L. casei*.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*. Soro de queijo. Xilo-oligossacarídeos. Simbiótico.

BANDIERA, N. S. **Development of a symbiotic powder in addition to food products.** 2014. 51. Trabalho de Conclusão de Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados – Universidade Norte do Paraná, Cidade, 2014.

### ABSTRACT

In this work, we developed a symbiotic powder for addition in different food products, with the use of xylo-oligosaccharide and probiotic microorganism. For this, the following steps were taken: 1) definition of the sources of carbon and nitrogen to be used, which resulted in greater population of the species probiotic (*Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*) evaluated using fractional factorial experimental design pattern 26-4; 2) optimization of the concentration of each component selected in the previous step, and temperature parameters for the multiplication of probiotics through Box-Behnken experimental matrix ( $3^3$ ) beyond the incubation time; 3) definition of the method of drying medium formulated containing probiotic; 4) formulation of symbiotic powder. Microbial populations were evaluated using analysis of variance (ANOVA) and Tukey test at 5% significance level, and all data analyzes were performed using the Statistica program. The sources of carbon and nitrogen which together promoted greater proliferation of *L. casei* and *L. acidophilus* were, respectively, 16% whey (w / v) and 2.5% ammonium sulfate (w / v) and 12% whey (w / v) and 7% of yeast extract (w / v). The best temperatures for multiplication in defined media were 35 ° C for *L. casei* and 39 ° C for *L. acidophilus*. There was no difference in the populations of the two organisms listed in defined media as after 24h and 48h, indicating that the incubation time of probiotics in the media, before drying, can be 24h. The defined medium inoculated with *L. casei* and incubated at 35 ° C was the one that had the largest population of the probiotic microorganism after drying (over 9 log cycles). The developed powder was formulated adding 3,5 g of xylotriose in 10g of the probiotic powder containing *Lactobacillus casei*.

**Key words:** Lactobacillus. Whey. Xylo-oligosaccharides. Symbiotic.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	14
2.2 INGREDIENTES PREBIÓTICOS.....	16
2.3 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	18
<b>3 ARTIGO</b> .....	21
<b>4 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	46
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação com a alimentação saudável, aliada à diversidade de tecnologias na área de alimentos, vem gerando o interesse pela elaboração de novos produtos que associem a qualidade nutricional e as propriedades funcionais.

A utilização de culturas probióticas, pela indústria de laticínios vem ganhando destaque na última década, com o lançamento no mercado, de uma série de produtos funcionais. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, exercem efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor (SANDERS, 2003).

Dentre os benefícios à saúde estão: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção dos ácidos acético e lático, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estimulação do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

Porém, para que os efeitos benéficos ocorram, a dose mínima diária da cultura probiótica ingerida deve ser de  $10^8$  a  $10^9$  UFC, o que corresponde ao consumo diário de 100 g de produto que contenha  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g ou mL (LEE; SALMINEN, 1995; RYBKA; FLEET, 1997; VINDEROLA; RENHEIMER, 2000). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento probiótico pronto para o consumo apresente entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC do microrganismo utilizado (BRASIL, 2008).

Assim, considerando-se que diversos fatores interferem na viabilidade dos microrganismos probióticos nos alimentos e durante sua passagem pelo trato gastrointestinal, é interessante que a multiplicação dessas bactérias seja estimulada, a fim de que sua população seja alta o suficiente para promover os efeitos benéficos no intestino do hospedeiro.

Uma maneira de estimular a multiplicação dos probióticos é a adição destes juntamente com substâncias prebióticas. Os prebióticos são ingredientes não digeríveis que estimulam, de maneira seletiva, a multiplicação e/ou a atividade de espécies bacterianas presentes no cólon intestinal exercendo um efeito benéfico para a saúde do indivíduo (ZIEMER; GIBSON, 1998; LEE et al., 1999).

Os prebióticos, geralmente oligossacarídeos, são oligômeros compostos de 2 a 10 monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas (NAKAKUKI, 2003). A ação prebiótica de carboidratos como os fruto-oligossacarídeos, os galacto-oligossacarídeos, os glico-oligossacarídeos e os xilo-oligossacarídeos tem sido estudada (MAHONEY, 1998; TUNGLAND; MEYER, 2002) há mais de 10 anos.

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligômeros de açúcar, que apresentam unidades de xilose em sua estrutura, fazendo-se presentes, naturalmente, em frutos, leite, mel e vegetais (VÁZQUEZ et al., 2000). A ação prebiótica dos XOS já foi confirmada através de testes de fermentação *in vitro*, utilizando-se inóculos de fezes (GULLÓN et al., 2010), mas não em alimentos.

Desta maneira, o desenvolvimento de um pó contendo XOS e *Lactobacillus* abre uma nova perspectiva de mercado, podendo ser ingerido juntamente com um suco ou leite, ou até ser utilizado pela indústria, por exemplo, na fabricação de produtos lácteos simbióticos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

O termo probiótico originou-se do grego e significa “para a vida” (COPPOLA; CONCEIÇÃO; GIL-TURNES, 2004). Podem ser chamados probióticos os microrganismos capazes de promover o bem estar e a saúde, auxiliando na prevenção de algumas patologias (THAMER; PENNA, 2005).

Antigamente, os probióticos eram definidos como “suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Devido ao grande interesse pelo assunto, já surgiram várias outras definições. Contudo, a mais atual e aceita internacionalmente é que eles são “microrganismos vivos que, quando utilizados em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

Alguns gêneros bacterianos comumente utilizados como probióticos são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. *Enterococcus* e algumas cepas de fungos pertencentes ao gênero *Saccharomyces* também podem ser utilizadas (GIBSON; ROBERFROID, 1995; JIM; MARQUART; ZAO, 2000; ALVAREZ-OLMOS; OBERHELMAN, 2001).

Segundo Sleator e Hill (2009), há três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos: 1) bacteriocinas produzidas por eles podem destruir patógenos invasores, através da lise de suas células; 2) os probióticos podem mimetizar receptores de superfície, impedindo a adesão do patógeno à membrana celular do hospedeiro; 3) microrganismos probióticos podem neutralizar toxinas produzidas patógenos, dentro do organismo humano.

De acordo com Fuller (1989), os probióticos podem, ainda, competir com os patógenos por nutrientes e sítios de ligação, alterar a atividade enzimática desses microrganismos e, também, estimular a imunidade do hospedeiro, por meio do aumento nos níveis de anticorpos e da atividade de macrófagos. A digestão parcial da lactose e o estímulo da atividade da lactase presente na mucosa intestinal são citados por Macfarlane e Cummings (1999).

Para que exerça o efeito benéfico proposto, o microrganismo probiótico deve, necessariamente, sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (ácidos, bile e enzimas pancreáticas) e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Além do controle da microbiota intestinal, há ainda outros benefícios das culturas probióticas à saúde do hospedeiro, tais como: estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estímulo do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

Outros efeitos podem, também, ser atribuídos ao uso das culturas probióticas, como a diminuição do risco de câncer de cólon, prevenção contra doenças cardiovasculares, redução das concentrações plasmáticas de colesterol, efeito anti-hipertensivo, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite ulcerativa provocada por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (TUOHY et al., 2002).

Para se selecionar uma bactéria probiótica, deve-se utilizar alguns critérios: gênero de origem humana; estabilidade frente ao ácido e à bile; capacidade de aderir à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; capacidade de produzir compostos antimicrobianos; ser metabolicamente ativo no intestino; ter histórico de não patogenicidade; ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000).

Além disso, os probióticos devem ser utilizados na fabricação de produtos alimentícios, com base no seu desempenho tecnológico. Uma cultura probiótica com boas propriedades tecnológicas deve apresentar elevada multiplicação no produto, promover propriedades sensoriais adequadas, além de ser estável e viável durante a vida-de-prateleira do alimento. Desta maneira, a cultura pode ser manipulada e incorporada no produto alimentício sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em um produto com textura e aroma adequados (OLIVEIRA et al., 2002).

No ambiente intestinal, as bactérias probióticas promovem efeitos biológicos somente se atingirem um número mínimo neste local. A dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de  $10^8$  a  $10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia), o que corresponde ao consumo de 100 g de um produto que contenha  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (LEE; SALMINEN, 1995; RYBKA; FLEET, 1997; VINDEROLA; RENHEIMER, 2000).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo apresente entre  $10^8$  e  $10^9$

Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do probiótico utilizado, referente à quantidade de microrganismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente (SAAD, 2006).

A viabilidade das bactérias probióticas em um alimento pode ser comprometida pela presença de substâncias inibitórias que se formam durante a produção e o armazenamento do produto sob refrigeração, o estado fisiológico dos microrganismos probióticos adicionados, as condições físicas de estocagem (tempo, temperatura), a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados (conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes de nitrogênio, conteúdo mineral, atividade de água, conteúdo de oxigênio), as condições de cultivo e as possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas *starter* (SHAH, 2000; HELLER, 2001).

A fim de evitar uma redução das populações de probióticos em um alimento, a adição de alguma substância que estimule a sua multiplicação, como os prebióticos) é uma opção. A combinação de probióticos e compostos prebióticos pode melhorar a sobrevivência desses microrganismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal, aumentando seus efeitos no intestino grosso (ROBERFROID, 2000).

## 2.2 INGREDIENTES PREBIÓTICOS

O termo prebiótico foi definido por Gibson e Roberfroid (1995), como sendo ingredientes não digeríveis que podem ser adicionados aos alimentos, com o objetivo de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, devido à sua atuação como substrato seletivo no cólon. Uma vez que essa definição assemelha-se, em partes, com a definição de fibra dietética (SCHREZENMEIR; DEVRESE, 2001), é necessário que os critérios para a classificação de um ingrediente como prebiótico sejam bem definidos. De acordo com VanLoo (2004) e Biedrzycka e Bielecka (2004), para ser considerado prebiótico, o ingrediente deve resistir à hidrólise enzimática, à acidez gástrica e à absorção gastrointestinal, deve ser fermentado pela microbiota presente no intestino e, ainda, deve estimular, seletivamente, a multiplicação e/ou a atividade de bactérias intestinais relacionadas com a saúde e bem-estar.

No cólon, quando os prebióticos são fermentados por pelo menos uma das bactérias presentes, ocorre a produção de cadeias curtas de ácido graxo e gases, com consequente aumento de energia metabólica e proliferação dessa bactéria (ROBERFROID,

2002). Além disso, a funcionalidade destes ingredientes está relacionada ao aumento do tempo de esvaziamento do estômago, à modulação do trânsito do trato gastrointestinal e à diminuição de colesterol via adsorção de ácidos biliares (FERREIRA, 2000).

Na última década, o volume e a diversidade de oligossacarídeos prebióticos têm aumentado muito, à medida que as suas propriedades funcionais vão sendo estudadas e melhor compreendidas. São considerados prebióticos: a lactulose, o lactitol, o xilitol, a inulina e alguns oligossacarídeos não digeríveis e que estimulam seletivamente a multiplicação de bactérias benéficas no cólon (ZUBBILAGA et al., 2001).

A inulina e a oligofrutose são os oligossacarídeos cujos efeitos foram mais estudados (ROBERFROID, 2005). Eles pertencem a uma classe de carboidratos denominados frutanos e são considerados ingredientes funcionais por exercerem influência sobre processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, resultando em melhoria da saúde e em redução no risco de aparecimento de diversas doenças (ROBERFROID, 2002). As principais fontes de inulina e oligofrutose empregadas na indústria de alimentos são a chicória (*Cichorium intybus*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (CARABIN, FLAMM, 1999; KAUR, GUPTA, 2002).

A inulina e a oligofrutose são quimicamente similares, sendo formadas por subunidades de frutose ligadas entre si, e apresentando as mesmas propriedades nutricionais. Porém, as diferenças no tamanho das cadeias da inulina e das oligofrutoses são responsáveis pelas diferenças entre suas propriedades. Devido às cadeias mais longas, a inulina é menos solúvel que as oligofrutoses e possui capacidade de formar microcristais quando misturada com água e leite. Estes microcristais interagem para formar uma mistura cremosa e macia, promovendo a sensação de presença de gordura (NEVEN, 2001; NITSCHKE; UMBELINO, 2002; BONDT, 2003; MONTAN, 2003). Esses prebióticos podem ser adicionados a uma grande variedade de produtos alimentares, como alimentos dietéticos, produtos de panificação, bebidas de frutas (MORO et al., 2002).

Além dos fruto-oligossacarídeos, a ação prebiótica *in vitro* de outros carboidratos, como os galacto-oligossacarídeos, os glico-oligossacarídeos e os xilo-oligossacarídeos vem sendo estudada nos últimos anos (MAHONEY, 1998; TUNGLAND; MEYER, 2002).

## 2.3 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Com a grande busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis e com poucas calorias, muitos compostos alternativos têm surgido desde a década de 80. Dentre estes compostos, os xilo-oligossacarídeos (XOS) são de grande importância, devido às suas atividades funcionais (MENEZES; DURRANT, 2008).

Os XOS são produzidos a partir de materiais ricos em xilose, que geram, após hidrólise, compostos de cadeia longa (ENEYSKAYA et al., 2007). Para que possam ser utilizados em alimentos, este produto da hidrólise deve, ainda, passar por processos de refinamento, a fim de remover alguns compostos não desejados, como os não-sacarídicos. O processo de refinamento, na maioria das vezes, requer várias etapas. A cromatografia e a troca iônica são mecanismos utilizados para o refinamento de XOS provenientes da hidrólise de madeira (SHIMIZU et al., 1998). As tecnologias de membranas tem sido utilizadas para os processos relacionados a alimentos (KAMADA et al., 2002).

Os XOS podem ser considerados ingredientes de grande potencial, com um mercado emergente para sua aplicação em alimentos funcionais. O número de fatores responsáveis pela utilização dos XOS como ingrediente funcional relaciona-se à demanda do consumidor, ao incentivo da pesquisa científica sobre o fato de tais alimentos ajudarem a melhorar e manter a saúde e o bem-estar, além de seu papel na prevenção de algumas doenças (ALONOSO et al., 2003).

Além dos efeitos para a saúde, os XOS apresentam interessantes propriedades físico-químicas, como moderado poder adoçante, estabilidade em uma ampla variação de pH e temperatura, além de auxiliarem nas características sensoriais quando incorporados em alimentos (ALONOSO et al., 2003). Os xilo-oligossacarídeos possuem vantagem em relação aos outros oligossacarídeos, como os fruto-oligossacarídeos (FOS), pois são estáveis em valores de pH entre 2,5 e 8,0 (como os valores baixos de pH do suco gástrico) e em altas temperaturas (acima de 100 °C) (BHAT, 1998).

Na indústria alimentar, os XOS são utilizados na produção de adoçantes de baixa caloria com xilitol e componentes antioxidantes (PARAJÓ et al., 1997; MOURE et al., 2001). Doerr et al. (2002) relatam o uso dos XOS em bebidas, como realçador de sabor. Os XOS são utilizados em bebidas carbonatadas e em sucos com baixos valores de pH, apresentando, no processamento do alimento, vantagens sobre a inulina, relacionadas aos ácidos em aquecimento (MODLER, 1994).



Os efeitos prebióticos dos XOS podem ser confirmados através de testes *in vitro* de fermentação (GULLÓN et al., 2010) ou estudos *in vivo*. Os xilo-oligossacarídeos possuem efeitos benéficos para a saúde, principalmente em relação à microbiota intestinal (JEONG et al., 1998; GIBSON, 2004).

Rycroft et al. (2001) avaliaram a fermentação *in vitro* de diferentes oligossacarídeos considerados prebióticos, e observaram que os XOS promoveram uma maior multiplicação da bifidobactérias, quando comparados com outros oligossacarídeos.

De acordo com Crittenden et al. (2002), os XOS podem ser utilizados como fonte de carbono pelas bactérias, de forma seletiva. Estes autores avaliaram a ação *in vitro* dos XOS sobre diferentes bactérias probióticas, e observaram que várias espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus brevis* tiveram sua multiplicação estimulada na presença de XOS. Além disso, eles verificaram que alguns bacterióides isolados também fermentaram eficientemente o XOS, porém, *E. coli*, *Enterococcus*, *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens* não foram estimulados.

Suwa et al. (1999) observaram considerável aumento na população de *Bifidobacterium* sp. no trato gastrointestinal de ratos. Em testes realizados em humanos, foi observado que a xilobiose ingerida não foi eliminada nas fezes e na urina, em um período de 24 horas. Assim, como os compostos não são hidrolisados pela saliva, pancreatina ou pelo suco gástrico, os autores supõem que os XOS foram utilizados por bactérias intestinais, concluindo que a ingestão de XOS influenciou beneficemente na multiplicação microbiota intestinal (OKAZAKI et al., 1991).

Em estudos com a participação de mulheres que apresentavam constipação grave, revelou-se que a dieta com XOS reduziu sensivelmente este problema, sem ter sido verificada a ocorrência de efeitos adversos (TATEYAMA et al., 2005).

Dentre as espécies de *Lactobacillus*, a maioria utiliza XOS (OKAZAKI et al., 1990). Em relação a *Bifidobacterium*, comparando-se diferentes oligossacarídeos, verificou-se que eles preferiram os XOS, a rafinose e os FOS em relação às hexoses, sendo que em testes "*in vitro*" com essas bactérias, observou-se que os XOS foram mais eficazes do que a rafinose e tão eficazes quanto o FOS na promoção da multiplicação das bifidobactérias (JASKARI et al., 1998).

Estudos revelaram a eficiência dos XOS, provenientes da auto-hidrólise de sabugo de milho, no estímulo da multiplicação das culturas probióticas *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum*, *Lactobacillus brevis* e *L. fermentum*, demonstrando, inclusive,

ótimos resultados quando foram utilizados XOS de cadeias mais curtas (MOURA et al., 2007).

Assim, devido aos efeitos benéficos dos xilo-oligossacarídeos para a saúde humana, a utilização destes compostos, classificados como prebióticos, como ingredientes ativos em alimentos funcionais (CLYDESDALE, 1997; NABARLATZ et al., 2007; MOURA et al., 2007) é de grande interesse para a indústria.

**ARTIGO****DESENVOLVIMENTO DE UM PÓ SIMBIÓTICO PARA ADIÇÃO EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS**

Nataly Simões BANDIERA<sup>1</sup>, Raúl Jorge Hérnan Castro GOMEZ<sup>2</sup>, Elsa Helena Walter de SANTANA<sup>3</sup>, Cínthia Hoch Batista de SOUZA<sup>4</sup>, Caio Casale Aragon<sup>5</sup>, Lina Casale ARAGON-ALEGRO<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: naty\_bandiera@hotmail.com.

<sup>2</sup>Engenheiro químico, doutor em Ciência de Alimento pela Universidade Estadual de Campinas, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: rcastrog@yahoo.com.

<sup>3</sup>Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail:elsahws@hotmail.com.

<sup>4</sup>Bióloga, doutora em Tecnologia Bioquímica-farmacêutica pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail:cinthiahoch@yahoo.com.br.

<sup>5</sup>Nutricionista, doutor em Biotecnologia pela Universidade Júlio Mesquita Filho, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados,

Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail:cca@terra.com.br.

<sup>6</sup>Bióloga, doutora em Ciência dos Alimentos pela Univerisade de São Paulo, docente do curso de Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. RG: 26.285.095-3. CPF: 261.148.178-42. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br (autora para correspondência).

## RESUMO

Neste trabalho, desenvolveu-se um pó simbiótico para adição em diferentes produtos alimentícios, com a utilização de microrganismo probiótico e xilo-oligossacarídeo. Para isto, foram realizadas as seguintes etapas: 1) definição das fontes de carbono e de nitrogênio a serem utilizadas, que resultaram em maior população das espécies probióticas (*Lactobacillus casei* e *L. acidophilus*) avaliadas, utilizando-se delineamento experimental fatorial fracionado padrão de  $2^{6-4}$ ; 2) otimização da concentração de cada componente selecionado na etapa anterior, dos parâmetros e da temperatura para a multiplicação dos probióticos, através de matriz experimental Box-Behnken ( $3^3$ ) além do tempo de incubação; 3) definição do método de secagem do meio formulado contendo probiótico; 4) formulação do pó simbiótico. As populações microbianas foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, e todas as análises dos dados foram realizadas utilizando-se o programa Statistica. As fontes de carbono e de nitrogênio que, juntas, promoveram maior multiplicação de *L. casei* e de *L. acidophilus* foram, respectivamente, 16% de soro de queijo (m/v) e 2,5% de sulfato de amônio (m/v) e 12% de soro de queijo (m/v) e 7% de extrato de levedura (m/v). As melhores temperaturas para a multiplicação nos meios definidos foram 35°C para *L. casei* e 39°C, para *L. acidophilus*. Não houve diferença nas populações dos dois microrganismos quando enumerados nos meios definidos, após 24h e 48h, indicando que o tempo de incubação dos probióticos nos meios, antes da secagem, pode ser de 24h. O meio definido e inoculado com *L. casei* e incubado a 35°C foi o que obteve maior população do microrganismo probiótico após secagem, acima de 9 ciclos logarítmicos. O pó desenvolvido foi formulado adicionando-se 3,5 g de xilotriose em 10g do pó probiótico seco e moído, contendo *L. casei*.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*. Soro de queijo. Xilo-oligossacarídeos. Simbiótico.

## 1 INTRODUÇÃO

A busca do consumidor por alimentos que tragam benefícios a saúde, tem estimulado o consumo por alimentos funcionais, estimulando o mercado deste tipo de produto. Em particular, a indústria de laticínio, encontrou através do microrganismo probiótico uma ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos (SAAD et al, 2011).

Alimentos funcionais são aqueles que possuem ação nutricional adequada e podem demonstrar benefícios adicionais em uma ou mais funções do organismo, trazendo melhorias do estado de saúde e bem estar ou diminuindo o risco de doenças. O típico alimento funcional é representado pelos probióticos, os quais são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequadas, trazem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; SOARES et al., 2011).

Dentre os benefícios à saúde estão: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção dos ácidos acético e lático, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato; estimulação do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

Porém, para que os efeitos benéficos ocorram, a dose mínima diária da cultura probiótica ingerida deve ser de  $10^8$  a  $10^9$  UFC, o que corresponde ao consumo diário de 100 g de produto que contenha  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g ou mL (LEE; SALMINEN, 1995; Rybka; Fleet, 1997; Vinderola; Renheimer, 2000). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento probiótico pronto para o consumo apresente entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC do microrganismo utilizado (BRASIL, 2008).

Assim, considerando-se que diversos fatores interferem na viabilidade dos microrganismos probióticos no processamento dos alimentos e durante sua passagem pelo trato gastrointestinal, é interessante que a multiplicação dessas bactérias seja estimulada, a fim de que sua população seja alta o suficiente para promover os efeitos benéficos no intestino do hospedeiro.

Uma maneira de estimular a multiplicação dos probióticos é a adição destes juntamente com substâncias prebióticas. Os prebióticos são ingredientes não digeríveis

que estimulam, de maneira seletiva, a multiplicação e/ou a atividade de espécies bacterianas presentes no cólon intestinal exercendo um efeito benéfico para a saúde do indivíduo (ZIEMER; GIBSON, 1998; LEE et al., 1999).

Os prebióticos, geralmente oligossacarídeos, são oligômeros compostos de 2 a 10 monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas (NAKAKUKI, 2003). A ação prebiótica de carboidratos como os fruto-oligossacarídeos, os galacto-oligossacarídeos, os glico-oligossacarídeos e os xilo-oligossacarídeos tem sido estudada (MAHONEY, 1998; TUNGLAND; MEYER, 2002) há mais de 10 anos.

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligômeros de açúcar, que apresentam unidades de xilose em sua estrutura, fazendo-se presentes, naturalmente, em frutos, leite, mel e vegetais (VÁZQUEZ et al., 2000). A estrutura de XOS, varia de acordo com o grau de polimerização, as unidades monoméricas, e os tipos de ligações. Geralmente os XOS são misturas de oligossacarídeos formados com resíduos de xilose ligados através da ligação  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  4) (AACHARY; PRAPULLA 2008). O número de resíduos de xilose envolvidos na sua formação pode variar entre 2 e 10 e eles são conhecidos como xilobiose, xilotriose, e assim por diante (VÁZQUEZ et al., 2000).

A ação prebiótica dos XOS já foi confirmada através de testes de fermentação *in vitro*, utilizando-se inóculos de fezes (KARPPINEN et al., 2001; VARDAKOU et al., 2007; WILLIAMS et al., 2010; GULLÓN et al., 2010).

Desta maneira, o desenvolvimento de um pó contendo XOS e probióticos abre uma nova perspectiva de mercado, podendo ser ingerido juntamente com um suco ou leite, ou até ser utilizado pela indústria, por exemplo, na fabricação de produtos lácteos simbióticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um pó simbiótico para adição em produtos alimentícios.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

Para a elaboração deste projeto foram utilizados soro de queijo (Comfepar, Londrina, Brasil), glicose (Synth, Diadema-SP, Brasil), lactose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), peptona (Himedia, Mumbai, India), carbonato de cálcio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), celulose microcristalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), extrato de levedura (Himedia, Mumbai, India) e sulfato de amônio (Química Moderna, Barueri, Brasil), Plate

Count Agar (Himedia, Mumbai, Índia), agar MRS deMan, Robosa e Sharp (Himedia, Mumbai, Índia), caldo MRS (Himedia, Mumbai, Índia). Os microrganismos probióticos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, ambos liofilizados e armazenados a -18°C, adquiridos da Christian Hansen Indústria e Comércio (Valinhos, Brasil) e a xilotriose, da Megazyme (Wicklow, Ireland).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Preparo dos inóculos

Os microrganismos *L. casei* e *L. acidophilus*, liofilizados e armazenados sob refrigeração (4°C) foram ativados, separadamente, em 20 mL de caldo MRS esterilizado (121°C / 15 min), e incubados a 37°C durante 24 h. Após esse período, 10% do caldo com crescimento foram transferidos para um novo frasco contendo 40 mL de caldo MRS, incubado durante 24 h a 37°C. Em seguida, o caldo com crescimento foi, centrifugado a 559 g durante 5 min. e o precipitado, lavado com 40 mL de solução salina 0,85 % esterilizada (121 °C / 15 min.). Após nova centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores, a massa celular obtida foi resuspendida em solução salina 0,85% esterilizada (121°C / 15 min.), constituindo, assim, o inóculo para os procedimentos seguintes.

### 2.2.2 Definição dos parâmetros de cultivo

A fim de se definirem as fontes de nitrogênio e carbono a serem utilizadas para o cultivo dos microrganismos probióticos, foi realizada a avaliação dos efeitos destes compostos sobre a multiplicação de *L. casei* e *L. acidophilus*, separadamente, aplicando-se o delineamento experimental fatorial fracionado padrão de  $2^{6-4}$ , com 6 fatores independentes e 16 experimentos. O delineamento experimental foi planejado com a utilização do programa computacional Statistica.

A Tabela 1 indica os valores reais dos componentes e seus níveis de variações (+1 e -1), correspondentes ao delineamento experimental codificado da Tabela 2.



**Tabela 1.** Valores reais e codificados das variáveis utilizadas no planejamento experimental.

Variáveis	Níveis (%)	
	-1	+1
Glicose	0,7	7
Sacarose	0,7	7
Soro de Leite	1	10
Peptona	0,2	2
Extrato de levedura	0,2	2
Sulfato de amônia	0,01	1

**Tabela 2.** Delineamento experimental fatorial fracionado padrão de  $2^{6-4}$ , com 6 fatores independentes e 16 experimentos.

Experimento	Glicose	Sacarose	Soro de Leite	Extrato de Levedura	Peptona	Sulfato de amônia
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	+1	+1	-1	-1	-1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Foram realizados 16 experimentos com *L. casei* e outros 16, com *L. acidophilus*. Para cada um deles, adicionaram-se os compostos definidos na Tabela 1, nos

níveis descritos na Tabela 2, em 20 mL de água destilada. Os meios foram esterilizados em autoclave (121°C / 15 min.), inoculados com os microrganismos (preparados de acordo com o item 2.2.1) e incubados a 37°C. Após 24 horas, as populações de *L. casei* e *L. acidophilus* foram determinadas em Plate Count Agar (PCA, Himedia, Mumbai, Índia) expressas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) / mL, para cada um dos experimentos.

### 2.2.3 Otimização das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio selecionadas e do tempo e temperatura de incubação

Após serem selecionadas as fontes de carbono e de nitrogênio de acordo com o item 2.2.2, realizou-se a otimização das concentrações dessas fontes, além da temperatura de incubação. Os experimentos foram realizados utilizando-se a matriz experimental Box-Behnken (3<sup>3</sup>) com 3 níveis de variação para 3 fatores independentes (soro de queijo, extrato de levedura e temperatura), totalizando 15 experimentos, com 3 experimentos no ponto médio, para *L. acidophilus* (Tabela 3) e para *L. casei* (Tabela 5). Os níveis de variação utilizados para *L. acidophilus* e *L. casei* são mostrados nas Tabelas 4 e 6, respectivamente.

**Tabela 3.** Matriz Experimental Box-Behnken (BOX et al., 1978), com 3 fatores independentes e 15 experimentos para *L. acidophilus*.

Experimentos	Soro de queijo	Extrato de levedura	Temperatura
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

**Tabela 4.** Níveis de variação utilizados na otimização da produção do meio de cultivo para *L. acidophilus*.

<b>Variáveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
Soro de Queijo, % (m / v)	6,0	11,0	16,0
Extrato de Lev. % (m / v)	3,0	7,0	11,0
Temperatura, °C	30	35	40

**Tabela 5.** Matriz Experimental Box-Behnken (Box et al., 1978), com 3 fatores independentes e 15 experimentos para *L. casei*.

<b>Experimentos</b>	<b>Soro de queijo</b>	<b>Sulfato de amônio</b>	<b>Temperatura</b>
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

**Tabela 6.** Níveis de variação utilizados na otimização da produção do meio de cultivo para *L. casei*.

<b>Variáveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
Soro de Queijo, % (m / v)	6,0	11,0	16,0
Sulfato de Amônio % (m / v)	0,5	2,5	4,5
Temperatura, °C	30	35	40

As respostas ou variáveis dependentes consideradas, a fim de definir as melhores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, para cada microrganismo, além da melhor temperatura de incubação, foram as populações dos probióticos, verificadas, em cada experimento, através de contagem total em placas contendo PCA, incubadas a 37°C. Após 72 horas, as populações de *L. casei* e *L. acidophilus* nos meios foram estimadas e os resultados, expressos em UFC/ mL.

Para a definição do tempo de incubação do meio de cultivo, os microrganismos probióticos foram incubados nas condições definidas no item 2.2.2, separadamente, durante 24 e 48 h, a fim de se verificar o tempo que promove maior multiplicação dos probióticos. Após estes períodos em estufa, os microrganismos foram enumerados em ágar PCA e MRS (Himedia), incubados a 37°C, durante 48h, em aerobiose.

### 2.3 SECAGEM DOS MEIOS DE CULTIVOS CONTENDO MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Os caldos com os crescimentos foram adicionados de soro de queijo em pó (1:1) e divididos em duas partes, tendo sido a primeira desidratada à 40°C em estufa bacteriológica, e a segunda, liofilizada a - 45°C, ambas durante 24 h. Após esse período, os produtos obtidos foram moídos utilizando-se cadinho e bastão.

Em seguida, alíquotas dos pós obtidos foram diluídas e semeadas em placas contendo ágar PCA e MRS, incubadas a 37°C. Após 48h, as colônias foram contadas e a população, estimadas. Os pós probióticos obtidos foram conservados em embalagens de polietileno esterilizadas (Whirl-Pak, Nasco, Wisconsin, EUA).

### 2.4 PREPARO DO PÓ SIMBIÓTICO

O pó obtido no item 2.3, no qual se obteve a maior população de probiótico foi utilizado para o preparo do pó simbiótico. Para isto, adicionou-se a ele a substância prebiótica xilotriose (Megazyme, Wicklow, Ireland), em proporção de 55 % (m/m).

### 2.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa Statistica.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 SELEÇÃO DOS COMPONENTES

Na Tabela 7, observam-se o desenho experimental e as populações de *L. casei* e *L. acidophilus* obtidas em cada um dos 16 experimentos realizados, a fim de se definirem as fontes de nitrogênio e carbono a serem utilizadas para o cultivo dos microrganismos probióticos.

**Tabela 7.** Delineamento experimental fatorial fracionado padrão de  $2^{6-4}$ , com 6 fatores independentes e 16 experimentos e populações de *L. casei* e *L. acidophilus* (log UFC/mL) ao final de cada um dos experimentos.

Experimento	Glicose	Sacarose	Soro de Queijo	Extrato de Levedura	Peptona	Sulfato de amônia	L.a.	L.c.
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,74	8,2
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	8,66	8,36
3	-1	+1	+1	-1	-1	+1	8,92	8,32
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	9,3	8,2
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	9,15	9,28
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	6,3	9,11
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	8,86	9,32
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	7,6	9,26
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	6,9	8,63
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1	7,11	8,36
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	7,00	8,9
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	7,00	8,49
13	+1	+1	-1	-1	-1	+1	9,38	9,18
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	9,20	9,23
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	9,11	9,18
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	8,93	9,15

L.a. = população de *Lactobacillus acidophilus*

L.c. = população de *Lactobacillus casei*

Dentre os 16 experimentos realizados, as maiores populações de *L. acidophilus* foram observadas nos de número 4 e 13 e, para *L. casei*, nos de número 5 e 7.

Os valores de p e os efeitos das fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas e das suas interações na população de *Lactobacillus casei* são demonstrados na Tabela 8. Observa-se que coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,88537, indicando que 88,53% da variabilidade obtida na variável resposta (população de *L. casei*) são explicadas pelo modelo utilizado.

**Tabela 8.** Valores de p e efeitos das fontes de carbono e nitrogênio e de suas interações na produção de meio de cultivo para *Lactobacillus casei*.

Fator	<i>L. casei</i>	
	Efeito	p
Média/Interação	8,823125	0,000000
Glicose (1)	-0,106250	0,246729
Sacarose (2)	0,058750	0,485416
Soro de queijo(3)	0,781250	0,001818
Extrato de Levedura (4)	0,133750	0,168554
Peptona (5)	0,056250	0,502623
Sulfato de Amônio (6)	-0,088750	0,316663
3 com 5	-0,048750	0,557243
1 com 3	0,053750	0,520332
2 com 3	-0,031250	0,701366
3 com 4	-0,191250	0,081543
3 com 6	0,021250	0,792767
$R^2$	0,88537	

Na Tabela 8, verificou-se que, entre as fontes de carbono avaliadas, o soro de queijo apresentou o melhor efeito sobre a população de *L. casei* (+ 0,78125), tendo sido este significativo ( $p = 0,001818$ ), ou seja, dentro da faixa de concentração de soro estudada, qualquer aumento na quantidade do soro de queijo no meio de cultura irá provocar um aumento significativo na população do probiótico.

Em relação aos efeitos das fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio) sobre a população de *L. casei*, observou-se que estes não apresentaram significância. Cabe salientar, entretanto, que a interação do soro de queijo com o sulfato de amônio foi a única que apresentou um efeito positivo (+0,02125), embora não significativo ( $p = 0,792767$ ) (Tabela 8).

Desta forma, o soro de queijo e o sulfato de amônio foram selecionados como as melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, para constituição do meio de cultivo utilizado para a multiplicação de *L. casei*.

Ao longo dos anos, a indústria láctea tem reconhecido que o soro de queijo é um ingrediente bastante versátil e que pode contribuir na produção de alimentos lácteos fermentados por microrganismos probióticos (BALDISSERA et al., 2011).

Os valores de p e os efeitos das fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas e das suas interações na população de *Lactobacillus acidophilus* são demonstrados na Tabela 9. Observa-se que coeficiente de determinação ( $R^2$ ), foi de 0,8746, indicando que 87,46% da variabilidade obtida na variável resposta (população de *L. acidophilus*) são explicadas pelo modelo utilizado.

**Tabela 9.** Valores de p e efeitos das fontes de carbono e nitrogênio e de suas interações na produção de meio de cultivo para *Lactobacillus acidophilus*.

Fator	<i>L. acidophilus</i>	
	Efeito	p
Média/Interação	8,260000	0,000001
Glicose (1)	-0,495000	0,246489
Sacarose (2)	0,160000	0,683718
Soro de queijo(3)	0,612500	0,168583
Extrato de Levedura (4)	-0,362500	0,376786
Peptona (5)	0,167500	0,670086
Sulfato de Amônio (6)	-0,090000	0,817347
3 com 5	0,230000	0,747221
1 com 3	-0,622500	0,163253
2 com 3	-0,042500	0,912904
3 com 4	1,540000	0,013480
3 com 6	-0,297500	0,460716
$R^2$ 0,8746		

Verifica-se, na Tabela 9, que apesar de a sacarose ter afetado positivamente a população de *L. acidophilus* (+0,16), entre as fontes de carbono avaliadas, o soro de queijo apresentou o melhor efeito sobre este microrganismo (+ 0,6125). O fato de nenhum dos efeitos dessas duas fontes de carbono ter sido significativo, indica que sua presença no meio de cultivo poderá estimular moderadamente a multiplicação deste probiótico.

Em relação às fontes de nitrogênio, verifica-se, na Tabela 9, que seus efeitos na multiplicação de *L. acidophilus* não foram significativos, sendo a peptona a única fonte de nitrogênio que apresentou um efeito positivo na multiplicação deste probiótico. Salienta-se, entretanto, que a interação do soro de queijo com o extrato de levedura apresentou efeito positivo (+1,54) e, ao mesmo tempo, significativo ( $p < 0,05$ ), fato não observado nas interações do soro com as outras fontes de nitrogênio avaliadas.

A partir dos resultados obtidos, determinou-se que as melhores fontes de carbono e nitrogênio a serem utilizadas em um meio de cultivo para *L. acidophilus* são o soro de queijo e o extrato de levedura, respectivamente. De acordo com Hofvendal e Hahn-

Hagerdal (2000), meios de cultivo contendo soro de queijo e extrato de levedura melhoram relativamente a produtividade das fermentações.

A utilização de fontes de carbono de baixo custo, como soro de queijo, melão, amido e materiais lignocelulósicos, há tempo vêm sendo estudadas (HOFVENDAL; HAHN-HAGERDAL, 2000). Além disso, extrato de levedura, leite em pó, peptona e farelo de soja podem ser utilizados como suplementos (CHIARINI et al, 1992).

### 3.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO SELECIONADAS E DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

Para a otimização das concentrações do soro de queijo e do sulfato de amônia a serem utilizadas no meio de cultivo para *L. casei*, e da temperatura de incubação do meio inoculado, foram selecionadas 3 variáveis, que podem ser observadas na Tabela 10, na qual apresenta-se um desenho experimental Box-Behnken com 3 fatores independentes e 15 experimentos, além das populações de *L. casei*. Nesta tabela, observa-se que os experimentos em que se obtiveram as maiores populações deste probiótico foram o 2 e o 6, nos quais as concentrações e temperaturas determinadas resultaram em um melhor estímulo pra a mutiplicação do microrganismo selecionado.

**Tabela 10.** Matriz Experimental Box-Behnken (Box et al., 1978), com 3 fatores independentes e 15 experimentos e os resultados expressos em log UFC/ mL para *L. casei*.

Experimentos	Soro de queijo	Sulfato de amônio	Temperatura	L.c.
1	-1	-1	0	9,29
2	+1	-1	0	9,70
3	-1	+1	0	9,04
4	+1	+1	0	9,62
5	-1	0	-1	9,15
6	+1	0	-1	9,66
7	-1	0	+1	8,57
8	+1	0	+1	9,42
9	0	-1	-1	8,79
10	0	+1	-1	9,60
11	0	-1	+1	9,09
12	0	+1	+1	8,79
13	0	0	0	9,57
14	0	0	0	9,58
15	0	0	0	9,56

L.c.= *Lactobacillus casei*

Para estes experimentos, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,93822, indicando que 93,82% da variabilidade obtida na variável resposta é explicada pelo modelo



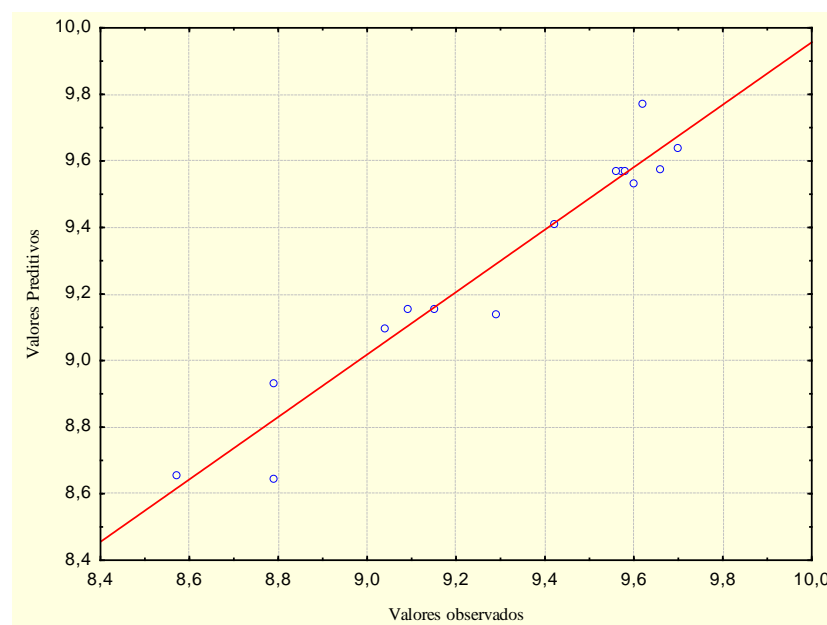
utilizado. A Análise de Variância e os efeitos do soro de queijo, do sulfato de amônio e da temperatura de incubação na multiplicação de *Lactobacillus casei* apresentam-se na Tabela 11. Verifica-se que o soro de queijo, de acordo com o modelo linear, é um fator importante e significativo na formulação do meio para *L. casei* ( $p = 0,002897$ ). Além deste fator, observa-se significância dos resultados obtidos tanto para o fator quadrático, quanto para o linear, em relação à variável temperatura ( $p = 0,006515$  e  $0,027876$ , respectivamente). As demais variáveis avaliadas não foram estatisticamente significativas.

**Tabela 11.** Efeitos das fontes de carbono e fontes de nitrogênio selecionadas e da temperatura de incubação na produção de meio de cultivo para *Lactobacillus casei*

Fator	Efeito	P
Média / Interação	9,226667	0,000000
(1)Soro (L)	0,587500	0,002897
Soro (Q)	0,012500	0,881636
(2)Sulf.Amon(L)	0,045000	0,695283
Sulf.Amon(Q)	0,145000	0,128849
(3)T°C (L)	-0,332500	0,027876
T°C (Q)	0,357500	0,006515
1L com 2L	0,085000	0,603175
1L com 3L	0,170000	0,317964
2L com 3L	-0,555000	0,015219

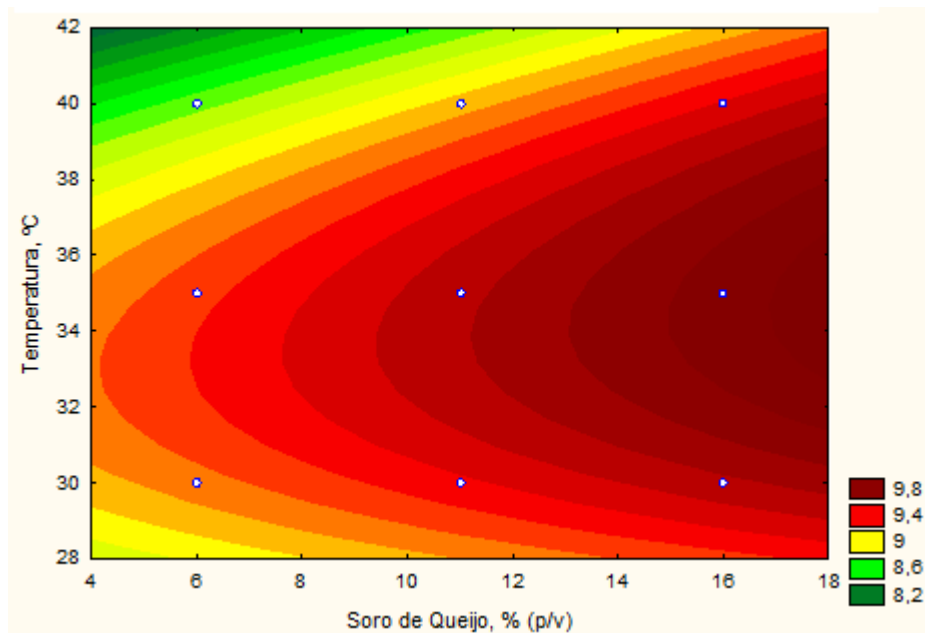
R<sup>2</sup>0,93822

As proporções descritas na Tabela 10 são confirmadas na Figura 1, que demonstra os valores observados e os valores preditivos, de acordo com o modelo proposto a Matriz Experimental Box-Behnken ( $3^3$ ).



**Figura 1.** Ajuste dos dados do desenho experimental fatorial Box-Behnken para *L. casei*.

Na Figura 2, observa-se o efeito da temperatura e da porcentagem de soro de queijo na enumeração de *L. casei*, quando a concentração utilizada de sulfato de amônio foi 2,5 g/ 100 mL (variável não significativa). Verifica-se que as maiores populações deste probiótico ocorrem em concentrações de soro de queijo entre 14% e 16% e temperatura de incubação entre 31°C e 37°C, aproximadamente.



**Figura 2.** Efeito da concentração de soro de queijo e da temperatura de incubação na enumeração de *Lactobacillus casei*.

Portanto, de acordo com os valores calculados a partir do modelo proposto pelo planejamento experimental fatorial fracionado  $3^3$  Box Behnken, a melhor composição do meio de cultivo para multiplicação de *L. casei* é 16% de soro de queijo (m/v) e 2,5% de sulfato de amônio (m/v) e temperatura de incubação de 35°C (Tabela 12).

**Tabela 12.** Valores esperados da população de *L. casei* a partir da variação dos fatores utilizados, empregando-se o modelo matemático.

Soro de queijo	Sulfato de amônio	Temperatura	População de <i>L. casei</i>
%	%	°C	log UFC/ mL
12	2,5	30	9,4200
14	2,5	30	9,4995
16	2,5	30	9,5750
16	2,5	35	9,8513
16	2,5	40	9,4125
16	4,5	35	9,7712
16	0,5	35	9,6412

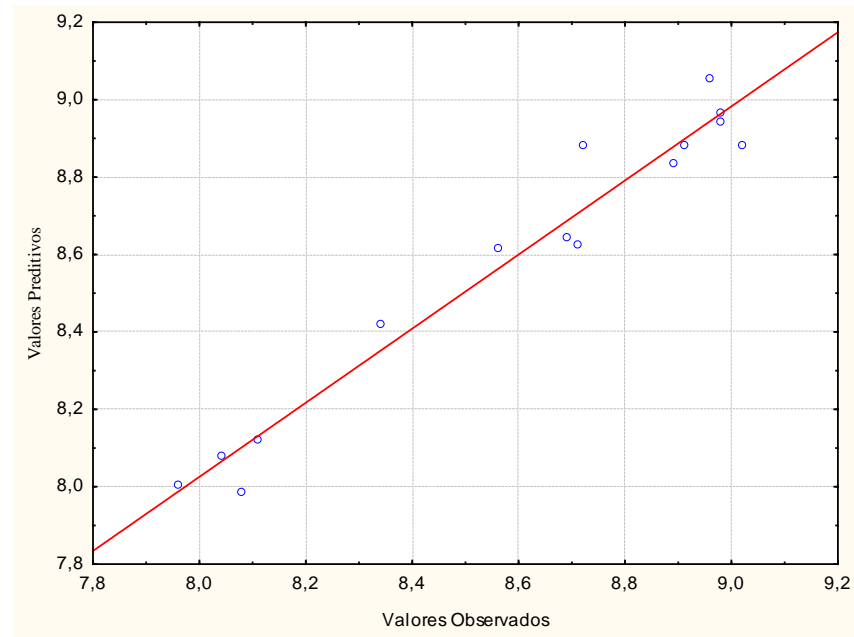
Na Tabela 13, apresenta-se o desenho experimental Box-Behnken com 3 fatores independentes e 15 experimentos e as populações de *L. acidophilus*. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,95721, indicando que o modelo determinado explica 95,721% em função dos componentes do meio de cultivo estudados.

**Tabela 13.** Matriz Experimental Box-Behnken (Box et al., 1978), com 3 fatores independentes e 15 experimentos e os resultados expressos em log UFC/ mL para *L. acidophilus*.

Experimentos	Soro de queijo	Extrato de levedura	Temperatura	L.a.
1	-1	-1	0	8,34
2	+1	-1	0	8,89
3	-1	+1	0	8,56
4	+1	+1	0	8,71
5	-1	0	-1	8,08
6	+1	0	-1	7,96
7	-1	0	+1	8,69
8	+1	0	+1	8,96
9	0	-1	-1	8,11
10	0	+1	-1	8,04
11	0	-1	+1	8,98
12	0	+1	+1	8,98
13	0	0	0	9,02
14	0	0	0	8,72
15	0	0	0	8,91

L.a. = *Lactobacillus acidophilus*

Considerando-se os experimentos realizados, o modelo linear é adequado para a descrição e interpolação da população de *L. acidophilus*. Essas proporções são confirmadas na Figura 3, onde observam-se os valores preditivos e observados, de acordo com a Matriz Experimental Box-Behnken ( $3^3$ ).



**Figura 3.** Ajuste dos dados do desenho experimental fatorial Box-Behnken para *L. acidophilus*

A Análise de Variância e os efeitos do soro de queijo, do extrato de levedura e da temperatura de incubação na multiplicação de *L. acidophilus* apresentam-se na Tabela 14.

**Tabela 14.** Efeitos das fontes de carbono e fontes de nitrogênio selecionadas e da temperatura de incubação na produção de meio de cultivo para *Lactobacillus acidophilus*.

Fator	Efeito	p
Média / Interação	8,525000	0,000000
(1)Soro (L)	0,212500	0,075680
Soro (Q)	0,181667	0,048469
(2)Ext. Lev(L)	-0,007500	0,940184
Ext. Lev(Q)	0,076667	0,323174
(3)T°C (L)	0,855000	0,000284
T°C (Q)	0,279167	0,010430
1L com 2L	-0,200000	0,197046
1L com 3L	0,195000	0,206671
2L com 3L	0,035000	0,805006

R<sup>2</sup> 0,95721

L= efeito linear

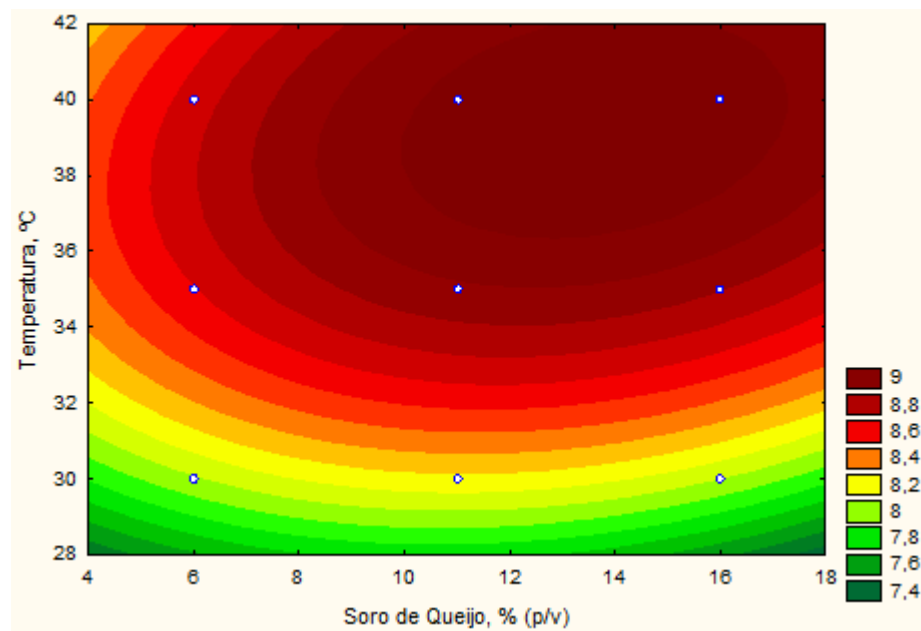
Q= efeito quadrático

De acordo com a Tabela 14, observa-se que as variáveis significativas foram a temperatura, tanto para o efeito quadrático, quanto para o linear ( $p = 0,010430$  e  $p = 0,000284$ , respectivamente), e as concentrações de soro de queijo, com significância para o efeito quadrático ( $p = 0,048496$ ). As demais variáveis não foram significativas.

Observa-se na Figura 4, o efeito da temperatura e da porcentagem de soro de queijo na enumeração de *L. acidophilus*, quando a concentração de extrato de levedura foi

de 7 g/ 100 mL (variável não significativa). Verificou-se que as maiores populações deste probiótico foram observadas quando se utilizou concentrações de soro de queijo entre 9% e 16% e temperatura de incubação entre 36,5°C e 40°C, aproximadamente.

De acordo com Gomes e Malcata (1999), a multiplicação de *L. acidophilus* pode ocorrer em altas temperaturas como 45° C, embora a condição ótima seja em torno de 35 - 40° C.



**Figura 4.** Efeito da concentração de soro de queijo e da temperatura de incubação na enumeração (UFC / mL) do *Lactobacillus acidophilus*.

Na tabela 15, observam-se os valores calculados de acordo com o modelo proposto pelo planejamento experimental fatorial fracionado  $3^3$  Box Behnken, na qual se indica que a melhor composição do meio de cultivo para multiplicação de *L. acidophilus* é por 12% de soro de queijo (m/v) e 7% de extrato de levedura (m/v) e a melhor temperatura de incubação é 39°C.

**Tabela 15.** Valores esperados da população de *L. acidophilus* a partir da variação dos fatores utilizados, empregando-se o modelo matemático.

Soro de queijo %	Extrato de levedura %	Temperatura °C	População de <i>L. acidophilus</i> log UFC / mL
10	7	35	8,8548
12	7	35	8,8973
13	7	35	8,8968
12	7	30	8,1711

12	7	39	9,0763
12	7	40	9,0650
12	3	35	8,8444

### 3.3 DEFINIÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DE *L. casei* E *L. acidophilus* NOS MEIOS DE CULTIVO

As populações dos microrganismos probióticos enumeradas após 24 e 48 h de incubação nas temperaturas pré estabelecidas no item 3.1.2, e semeados em ágar PCA e MRS estão mostradas nas Tabelas 16 e 17.

**Tabela 16.** Populações de *L. casei* nos meios de cultivo antes do processo de secagem.

Tempo de incubação / Meio de cultivo	População de <i>L. casei</i> (log UFC/ mL)
PCA / 24 h	2,89 x 10 <sup>9</sup>
PCA / 48 h	3,07 x 10 <sup>9</sup>
MRS / 24 h	7,00 x 10 <sup>9</sup>
MRS / 28 h	6,3 10 <sup>9</sup>

**Tabela 17.** Populações de *L. acidophilus* nos meios de cultivo antes do processo de secagem.

Tempo de incubação/ Meio de cultivo	População de <i>L. acidophilus</i> (log UFC/ mL)
PCA / 24 h	8,92 x 10 <sup>8</sup>
PCA / 48 h	8,35 x 10 <sup>8</sup>
MRS / 24h	5,00 x 10 <sup>8</sup>
MRS / 48 h	1,66 x 10 <sup>8</sup>

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a incubação de *L. casei* e *L. acidophilus* nos meios de cultivo e temperaturas definidas, durante 24 ou 48 horas em estufa, não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas populações finais dos mesmos. Sendo assim, optou-se por utilizar nos testes seguintes, para os dois probióticos avaliados, o menor tempo de incubação.

A população de *L. casei* presente no meio de cultivo, após 24 horas de incubação foi, em média,  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL, e a de *L. acidophilus*,  $7 \times 10^8$  UFC/mL. Esses resultados não foram diferentes estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Além disso, verificou-se que a semeadura dos caldos contendo os

probióticos em ágar PCA e ágar MRS não diferiu estatisticamente, demonstrando que o PCA pode ser utilizado nestes experimentos, uma vez que este tem menor custo.

### 3.4 DEFINIÇÃO DO MÉTODO DE SECAGEM E FORMULAÇÃO DO PÓ SIMBIÓTICO

As populações de *L. casei* e *L. acidophilus* nos pós simbióticos, após os processos de secagem em estufa e de liofilização estão apresentadas na Tabela 18. Verificou-se que, quando utilizado o método de secagem em estufa, para os dois microrganismos avaliados, não houve redução significativa das populações, quando estas foram comparadas com as obtidas no meio de cultivo antes do processo de secagem.

**Tabela 18.** Populações de *L. casei* e *L. acidophilus* nos meios de cultivo depois dos processos de secagem em estufa e liofilização.

Microrganismo	Método de secagem	
	Estufa	Liofilização
<i>L. casei</i>	$9,5 \times 10^9$	$4,4 \times 10^7$
<i>L. acidophilus</i>	$1,66 \times 10^8$	$<10^4$

Quando avaliada a população dos microrganismos após o processo de liofilização, verificou-se que houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na população de ambos, tendo sido maior a redução de *L. acidophilus*.

Essas reduções observadas após o processo de liofilização foram de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos para *L. casei* e mais de 4 ciclos logarítmicos, para *L. acidophilus*. Por estes motivos, optou-se por utilizar *L. casei* na elaboração do pó simbiótico, aplicando-se o processo de secagem em estufa. Esse resultado é importante, uma vez que o processo de secagem selecionado é mais simples e barato que a liofilização.

Após a secagem, a concentração de xilotriose adicionada ao pó probiótico foi de 55%, a fim de se cumprir a legislação.

O produto cuja composição apresenta *L. casei* se torna enriquecido, pois

relacionam-se a este microrganismo atributos como à proteção contra agentes infecciosos pela diminuição da colonização intestinal por patógenos (CANO, 2003), ativação das imunidades local e sistêmica (HORI et al., 2002; MEDICI et al., 2004), redução dos sinais clínicos de diarreia por rotavírus (GUÉRIN-DANAN et al., 2001), diminuição dos níveis de triglicérides séricos e de colesterol (MINELLI et al., 2004).

Uma das alternativas de reutilização do soro de leite é a formulação de novos produtos, ao invés do descarte. O soro é utilizado como matéria-prima na indústria alimentícia, mas ainda não é totalmente explorado, portanto é necessário um maior incentivo do seu aproveitamento (MIZUBUTI, 1994; ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001; SOUZA; BEZERRA; BEZERRA, 2005; KEMPKA et al., 2008; CALDEIRA et al., 2010; CASTRO et al. 2010; CHAVES; CALLEGARO; SILVA, 2010; MOREIRA et al., 2010). Assim, sua utilização para veículo agrega valor a esse resíduo.

As bactérias lácticas são amplamente utilizadas na produção de alimentos, na fermentação de leite, vegetais, salsichas, bebidas e produtos de panificação resultando em produtos com composição e sabor modificados e com vida de prateleira prolongada (KNORR, 1998).

Vale considerar que este pó desenvolvido pode ter diversas finalidades, desde a utilização industrial para adição em um leite saborizado, uma sobremesa láctea ou um achocolatado em pó, até o preparo deste pó como efervescente para que seja adicionado, por exemplo, em água.

#### **4 CONCLUSÃO**

O pó simbiótico foi elaborado a partir do cultivo de *Lactobacillus casei* em meio contendo 16% de soro de queijo (m/v) e 2,5% de sulfato de amônio (m/v), dissolvidos em 20 mL de água destilada esterilizada, incubado a 35°C, durante 24h, adicionado de soro de queijo (1:1), seco em estufa a 40°C, durante 24h, moído e adicionado de 22% de xilotriose. Estas condições foram as que resultaram em maior população do microrganismo probiótico, acima de 9 ciclos logarítmicos por grama de pó.

O produto desenvolvido, para ingestão diária de 10g, contém aproximadamente 10,8 log UFC de *L. casei* e 3,5 g de xilotriose, e atende aos parâmetros estabelecidos pelas Legislações vigentes.



## 5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K.E. de; BONASSI, I.A.; ROÇA, R. de O. Características Físicas e Químicas de Bebidas Lácteas Fermentadas e Preparadas com Soro de Queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p.187-192, 2001.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista das alegações aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 20 março 2014.

CALDEIRA, L.A. et al. Desenvolvimento de Bebida Láctea Sabor Morango Utilizando Diferentes Níveis de Iogurte e Soro Lácteo Obtidos com Leite de Búfala. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online, 2010. Disponível: <<http://submission.scielo.br/index.php/cr/article/view/21361/3276>> Acesso em: 14/02/2014

CANO P.G.; PERDIGÓN G. Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model. **J Dairy Res.** 2003; 70 (4): 433-440.

CASTRO, R.L.E de. et al. Desenvolvimento e Análise Sensorial de uma Bebida Láctea Probiótica à Base de Soro do Leite e Extrato Hidrossolúvel de Soja Sabor Morango. In: **27° Congresso Nacional de Laticínios**. Anais CNL (Congresso Nacional de Laticínios). Disponível em: <<http://cnlepamig.com.br/anais/poster.html>> Acesso em: 13/05/2013.

CHAVES, K.F.; CALLEGARO, E. das D.; SILVA, V.R.O. Utilização do Soro de Leite nas Indústrias de Laticínios da Região de Rio Pomba – MG. In: **27° Congresso Nacional de Laticínios**. Anais CNL (Congresso Nacional de Laticínios). Disponível em: <<http://cnlepamig.com.br/anais/poster.html>> Acesso em: 03/04/2014.

CUNHA, T. M.; ILHA, E. C.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; CASTRO, F. P. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 23-33, 2009.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. **Working Group Report**. Geneva: WHO, 2002. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. Acesso em: 03 de abril de 2014.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. Bifidobacterium spp. And Lactobacillus acidophilus : biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, n. 10, p. 139-157, 1999.

Guérin Danan C, Meslin JC, Chambard A, Charpilienne A, Relano P, Bouley C, Cohen J, Andrieux C. Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. **J Nutr.** 2001; 131 (1): 111-117.-

HOFVENDAL, Karin; Barbel Hahn- Hagerdal, 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, dalam. *Enzyme and microbial Technology*, no 26 tahun 2000, **halaman** 87-10.

Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. Argumentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2002; 9 (1): 105-108.

Howard MD, Gordon DT, Garleb KA, Kerley MS. 1995. Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. **J Nutri** 125:2604–9.

KARPPINEN, S.; LIUKKONEN, K.; AURA, A.-M.; FORSELL, P.; POUTANEN, K. In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oats bran and inulin by human faecal bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p.1469–1476, 2002.

KEMPKA, A.P. et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, p.170-177, 2008.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.6, p.241-245, 1995.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LIMA, K. G. et al. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Technology**. V. 42, p. 491–495, 2008.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.

Medici M, Vinderola CG, Perdígón G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **Int Dairy J.** 2004; 14 (7): 611-618.

Minelli EB, Benini A, Marzotto M, Sbarbati A, Ruzzenente O, Ferrario R, Hendriks H, Dellaglio F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **Int Dairy J.** 2004; 14 (8): 723-736.

MIZUBUTI, I.Y. Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, p. 80-94, 1994.

MOREIRA, R.W.M. et al. Avaliação Sensorial e Reológica de uma Bebida Achocolatada Elaborada a Partir de Extrato Hidrossolúvel de Soja e Soro de Queijo. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, p. 435-438, 2010

MUMTAZ, S.; REHMAN, S.U.; HUMA, N.; JAMIL, A.; NAWAZ, H. 2008. Xylooligosaccharide enriched yoghurt: physicochemical and sensory evaluation. *Pak J Nutri* 7(4):566–9.

NAKAKUKI, T. Development of Functional Oligosaccharides in Japan. **Trends Glycosci Glycotechnol**, v.15, p.57–64, 2003.

RYBKA, S.; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australia**, v. 49, n. 10, p. 471-75, 1997.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

SAAD, S. M. I. et al. Probióticos e Prebióticos em alimentos: sob aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Pobióticos e Prebióticos em alimentos fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. P. 23-49.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SOARES, D.S. et al. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.996-1002, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_pdf&pid=S0102-09352011000400027&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0102-09352011000400027&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 03 abr. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000400027>.

SOUZA, J.R.M. de; BEZERRA, J.R.M.V; BEZERRA, A.K.N.A. Utilização de Soro de Queijo na Elaboração de Pães. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 7, 2005.

TUNGLAND, B.C.; MEYER, D. Non-digestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p.73–92, 2002.

VARDAKOU, M.; PALOP, C.; GASSON, M.; NARBAD, A.; CHRISTAKOPOULOS, P. In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.41, p.584–589, 2007.

VÁZQUEZ, M.; ALONSO, J.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Xylo-oligosaccharides: manufacture and applications. **Trends Food Sci Technol**, v.11, p.387–393, 2000.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

WILLIAMS, B.A.; MIKKELSEN, D.; LE PAI, L.; GIDLEY, M.J. In vitro fermentation kinetics and end-products of cereal arabinoxylans and (1,3;1,4)-b-glucans by porcine faeces. **J. Cereal Sci.**, doi:10.1016/j.jcs.2010.09.003, 2010.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and sybiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Internacional Dairy Journal, Amerstam**, v. 8, p. 473-9, 1998.

#### **4 CONCLUSÃO GERAL**

O pó simbiótico foi elaborado a partir do cultivo de *Lactobacillus casei* em meio contendo 16% de soro de queijo (m/v) e 2,5% de sulfato de amônio (m/v), dissolvidos em 20 mL de água destilada esterilizada, incubado a 35°C, durante 24h, adicionado de soro de queijo (1:1), seco em estufa a 40°C, durante 24h, moído e adicionado de 22% de xilotriose. Estas condições foram as que resultaram em maior população do microrganismo probiótico, acima de 9 ciclos logarítmicos por grama de pó.

O produto desenvolvido, para ingestão diária de 10g, contém aproximadamente 10,8 log UFC de *L. casei* e 3,5 g de xilotriose, e atende aos parâmetros estabelecidos pelas Legislações vigentes.

## REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.L.; DOMÍNGUEZ, H.; GARROTE, G.; PARAJÓ, J.C.; VÁZQUEZ, M.J. Xylo-oligosaccharides: properties and production technologies. **Electron J Environ Agric Food Chem**, v.2, p.230–232, 2003.
- ALVAREZ-OLMOS, M.I.; OBERHELMAN, R.A. Probiotic agentes and diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clinical Infection Disease**, v.32, p.1567-76, 2001.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista das alegações aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 20 mai. 2013.
- BHAT, M.K. Oligosaccharides as functional food ingredients and their role in improving the nutritional quality of human food and health. **Recent Research Development Agriculture Food Chemistry**, v.2, p.787–802, 1998.
- BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degree of polymerization. **Trends Food Sci. Technol.** v.15, p.170–175, 2004.
- BONDT, V. Novas Tendências para Bebidas Funcionais. **Revista Brasil Alimentos**, n.18, 2003.
- CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Toxicol. Pharmacol.** v. 30, p. 268–282, 1999.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.
- COPPOLA, M.M.; CONCEIÇÃO, F.R.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1297-303, 2004.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends Food Science Technology**, v.7, p.353–361, 1996.
- CLYDESDALE, F.M. Aproposal for the establishmentof scientific criteria for health claims for functional foods. **Nutrition Research**, v.55, p.413-423, 1997.
- DOERR, M.; RITTER, G.; TER MEER, H.U. **Flavor enhancement of beverages. Patent Application** US 0146501 A1. 2002.
- ENEYSKAYA, E.V. et al. Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.457, p.225-234, 2007.
- FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. **Working Group**

**Report. Geneva: WHO, 2002.** Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. Acesso em: 03 de abril de 2014.

FERREIRA, C.L.L.F. Tecnologia para Produtos Lácteos Funcionais: Probióticos. **Bol. SBCTA**, v.1, n. 36, 2000.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of probiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-12, 1995.

GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Practice & Research**, v.18, p.287-298, 2004.

GULLÓN, P.; MOURA, P.; ESTEVES, M. P.; GIRIO, F. M.; DONMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.7482–7487, 2008.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p. 3745-3795, 2001.

JASKARI, J.; KONTULA, P.; SIITONEN, A.; JOUSIMIES-SOMER, H.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Oat beta-glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 49, p.175–181, 1998.

JEONG, K.J.; PARK, I.Y.; KIM, M.S.; KIM, S.C. High-level Expression of an Endoxylanase Gene from *Bacillus* sp. in *Bacillus subtilis* DB104 for the Production of Xylobiose from Xylan. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.50, p.113–118, 1998.

JIM, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucous. *Applied Environmental Microbiology*, v.66, p.4200-4, 2000.

KAMADA, T.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H.; SAGLAM, N.; IWAMOTO, S. Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides. **Eur. Food Res. Technol.** v. 214, p. 435–440, 2002.

KARPPINEN, S.; LIUKKONEN, K.; AURA, A.-M.; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oats bran and inulin by human faecal bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p.1469–1476, 2002.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v.27, n.7, p.703–714, 2002.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science and Technology* . v. 9, p. 295-306, 1998

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.6, p.241-245, 1995.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999. 211p.

McFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and probiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v.318, p.999-1003, 1999.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, Oxford, v. 63, n. 2, p. 147-154, 1998.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligosacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.38, n.2, p.587-592, mar-abr, 2008.

MONTAN, M., As fibras invisíveis, **Revista Brasil Alimentos**, n 19, v.4., 2003.

MORO, G.; MINOLI, I.; MOSCA, M.; FANARO, S.; JELINEK, J.; STAHL, B.; BOEHM, G. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. **JPGN**, v.34, p.291–295, 2002.

MOURA, P.; BARATA, R.; CARVALHEIRO, F.; GÍRIO, F.; LOUREIRO-DIAS, M.; PAULA-ESTEVEZ, M. In vitro fermentation of xylooligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **LWT**, v.40, p.963–972, 2007.

MODLER, H.W. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. **Intern Dairy J, Kamptville**, v.4, p.383-407, 1994.

NABARLATZ, D. et al. Autohydrolysis of agricultural byproducts for the production of xylooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.20-28, 2007.

Nakakuki, T. Development of Functional Oligosaccharides in Japan. **Trends Glycosci Glycotechnol**, v.15, p.57–64, 2003.

NEVEN, E. Inulina e oligofrutose – ingredientes multifuncionais para o desenvolvimento de produtos lácteos. **Revista Leite e Derivados**, n. 6, v. 11., 2001.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D.C. Fructooligosacarídeos: novos ingredientes funcionais. **Bol. SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 27-34, 2002.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI K.; ALEGRO J. H. A.; SAAD S. M. I. Aspecto tecnológico de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, 2002.

OKAZAKI, M.; FUJIKAVA, S.; MATSUMOTO, N. Effect of xylooligosaccharide on the growth of *Bifidobacteria*. **Bifidobacteria Microflora**, v.9, p.77–86, 1990.

OKAZAKI, M.; KODA, H.; IZUMI, R.; FUJIKAVA, S.; MATSUMOTO, N. In vitro digestibility and in vivo utilization of xylobiose. **J Jpn Soc Nutr Food Sci**, v.44, p.41–44, 1991 (in Japanese, abstract in English)

PARAJÓ, J.C. et al. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.115-120, 2004.

- RYBKA, S.; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Australia**, v. 49, n. 10, p. 471-75, 1997.
- RYCROFT, C.; JONES, M.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **J Appl Microbiol**, v.91, p.878–887, 2001.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Dig Liver Dis**, v.34, 2002.
- ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **Br. J. Nutr.**, v.93, p.13–25, 2005.
- SHAH, N. P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. **British Journal of Nutrition**, v. 84, Suppl. 1, p. S3-S10, 2000.
- SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.1, p.1-16, 2006.
- SANDERS, M. E. *Probiotics: considerations for human health*. *Nutrition Review*, New York, v.61, n.3, p.91-9, 2003.
- SCHREZENMEIR, J.; DEVRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, p.361–364, 2001.
- SHIMIZU, K.; SUDO, K.; ONO, H.; ISHIHARA, M.; FUJII, T.; HISHIYAMA, S. Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. **Biomass Bioenerg.**, v. 14, p.195–203, 1998.
- SUWA, Y. et al. *Bifidobacterium bifidum* proliferation promoting composition containing xylooligosaccharide. **USA Patent US 5939309**, 1999.
- TATEYAMA, I.; HASHI, K.; JOHNO, I.; IINO, T.; HIRAI, K.; SUWA, Y.; KISO, Y. Effects of xylooligosaccharide intake on severe constipation in pregnant women. **J Nutr Sci Vitaminol**, v.51, p.445–448, 2005.
- THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.
- TUOHY, K.M. et al. Using probiotics and prebiotics bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.721-9, 2002.
- TUNGLAND, B.C.; MEYER, D. Non-digestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p.73–92, 2002.



WILLIAMS, B.A.; MIKKELSEN, D.; LE PAI, L.; GIDLEY, M.J. In vitro fermentation kinetics and end-products of cereal arabinoxylans and (1,3;1,4)- $\beta$ -glucans by porcine faeces. **J. Cereal Sci.**, doi:10.1016/j.jcs.2010.09.003, 2010.

VARDAKOU, M.; PALOP, C.; GASSON, M.; NARBAD, A.; CHRISTAKOPOULOS, P. In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.41, p.584–589, 2007.

VANLOO, J. Prebiotics promote good health. The basis, the potential, and the emerging evidence. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 38, p.70–75, 2004.

VÁZQUEZ, M.; ALONSO, J.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Xylo-oligosaccharides: manufacture and applications. **Trends Food Sci Technol**, v.11, p.387–393, 2000.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G.R. *An overview of probiotics, prebiotics and sybiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. Internacional Dairy Journal, Amerstam*, v. 8, p. 473-9, 1998.

ZUBILLAGA, M. et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, p. 569-576, 2001.



